

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 14 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659123

研究課題名(和文) 視細胞を守護する網膜色素上皮細胞の恒常性維持機構の解明

研究課題名(英文) Homeostasis of retinal pigment epithelium essential for survival of photoreceptor cells

研究代表者

柴原 茂樹 (SHIBAHARA, Shigeki)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00154253

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：小眼球症関連転写因子Mitfは網膜色素上皮細胞の分化を制御する。Mitfの変異マウスblack-eyed white (bw)はメラノブラストの欠損により白毛と難聴を呈する。Mitf-bw遺伝子の特徴はレトロトランスポゾン(L1)の挿入であり、その結果、エクソン3、エクソン4、およびその両者を欠損するなどの異常なMitf-M mRNAが発現される。また、Mitf-M mRNAは脳でも発現され、bwマウスは、野生型マウスと比較しストレス環境に対する感受性が鈍化していた。さらに、ヒト網膜色素上皮細胞で発現するMITFを同定し、その発現にはbeta-カテニンが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Microphthalmia-associated transcription factor (Mitf) is required for differentiation of retinal pigment epithelium. The mouse homozygous for the black-eyed white (Mitf-bw) allele is characterized by white-coat color and deafness with black eye, due to the loss of melanoblasts. The Mitf-bw allele carries an insertion of L1 element in the Mitf gene, causing the deficiency of the melanocyte-specific Mitf-M. Moreover, alternatively spliced Mitf-M mRNA species are expressed in developing melanoblasts: Mitf-M mRNA lacking exon 3, exon 4, or both exons 3 and 4. These aberrant mRNAs are also expressed in the bw mouse brain. Importantly, Mitf-M mRNA is expressed in the mouse and human brain. Moreover, the bw mice show the altered volitional motor activity under a stressful environment.

We identified the MITF isoform expressed in the human retinal pigment epithelium. Moreover, the beta-catenin is responsible for maintaining the expression of MITF in the retinal pigment epithelium.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：網膜色素上皮 転写因子 メラニン L1エレメント MITF 生体防御 ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

(1) 網膜色素上皮細胞は、脱落・生成を繰り返す視細胞外節片を絶えず貪食し、ロドプシンの構成成分である 11-シス-レチナルを再生し視細胞に供給するなど、視細胞の生存・機能維持に必須である。網膜色素上皮細胞は光刺激と視細胞外節片の貪食過程で発生する活性酸素に絶えず曝露されており、最も過酷な環境で機能する脳神経系細胞である。事実、糖尿病性網膜症と加齢に伴う網膜変性症(加齢黄斑変性症と網膜色素変性症)の各病態には網膜色素上皮細胞の機能低下・障害が関与する。

(2) 小眼球症関連転写因子(MITF)は、神経堤由来のメラノサイトと脳由来の網膜色素上皮細胞の分化を制御する。我々はこれまでに、MITFの構造的多様性と機能を明らかにしてきた。MITFにはN末端のみが異なる複数のアイソフォームが存在し、それぞれ異なるプロモーターにより転写が制御されている。**MITF-M**はメラノサイト特異的に発現され、代表的なMITFアイソフォームである。

本報告では、MITFのマウス遺伝子を *Mitf* と表記する。*Mitf* の変異マウス(black-eyed white, bw)は全身のメラノサイトを欠損するため白毛と難聴を呈し、加齢に伴い網膜変性を呈する。bwマウスの本態は、*Mitf* 遺伝子のメラノサイト特異的プロモーター近傍のイントロン内への L1 エlement (レトロトランスポゾン) の挿入であり、メラノサイト特異的な *Mitf-M* の発現が選択的に障害されるが、*Mitf-A* などのアイソフォームの網膜色素上皮細胞における発現は維持される。さらに、bwマウスは、定常状態での呼吸数が少ないという特徴を呈し、10%低酸素あるいは10%高炭酸ガス吸入刺激に対して過剰応答する。すなわち、低酸素あるいは高炭酸ガス吸入時における呼吸数の増加程度が有意に高く、中枢性の化学感知機構の異常が示唆された。なお、無麻酔・無拘束下でマウスの換気機能を解析するため、我々が独自に開発した小型ボディープレスチモグラフを使用した。

2. 研究の目的

網膜は過酷な環境下にある神経組織であり、その機能維持は良好なQOLの達成に必須である。そこで、視細胞を守護する網膜色素上皮細胞の生存・機能維持機構の分子基盤を解明する。

3. 研究の方法

(1) bwマウスの行動様式の解析: bwマウスは中枢性の化学感知機構の異常を呈するため、行動異常などがある可能性がある。そこで、bwマウスの概日リズム、睡眠、学習能力(迷路試験、回避行動試験など)を解析し、

野生型マウスと比較・検討した。

(2) L1 エlementによる *Mitf* 遺伝子産物のスプライシングへの影響: bwマウスの本態は、*Mitf* 遺伝子のメラノサイト特異的プロモーター近傍のイントロン内への L1 エlement (レトロトランスポゾン) の挿入であり、メラノサイト特異的な *Mitf-M* の発現が選択的に抑制される。そこで、bwマウス皮膚からRNAを調製し、*Mitf* 選択的スプライシング産物(mRNA)の有無を解析した。さらに、脳の種々領域における *Mitf-M* の発現を解析した。

(3) *Mitf* 選択的スプライシング産物の機能解析: 選択的スプライシング産物のcDNAを作製し、その機能をARPE-19ヒト網膜色素上皮細胞における一過性発現系により解析した。すなわち、ドーパクロームトートメラゼ(DCT)あるいはチロシナーゼ遺伝子プロモーターの制御下にあるレポーターを用いて、*Mitf* の選択的スプライシング産物の転写活性化能、あるいは転写抑制作用を解析する。なお、DCTとチロシナーゼはメラニン合成系の酵素であり、網膜色素上皮細胞とメラノサイトに特異的に発現される。

(4) 網膜色素上皮細胞の恒常性維持機構の解析: 二種類のヒト網膜色素上皮細胞株(ARPE-19とD407)と市販の正常ヒト網膜色素上皮細胞を用いて、発現するMITFアイソフォームを解析した。さらに、網膜形成に関与するWntシグナル伝達系の関与を検討するため、ARPE-19細胞をβ-カテニン、あるいはβ-カテニンに対するsiRNAを用いてβ-カテニンの機能あるいは発現量を減少させ、上記指標の変化を解析した。

4. 研究成果

(1) bwマウスの概日リズムと学習能力(回避行動試験)を解析した結果、bwマウスは概日リズムを維持しており、学習能力も野生型マウスと同等であることが判明した。しかし、1回目の回避行動試験に際し、初めて明るい場所に置かれたbwマウスは有意に長くその場に留まった。すなわち、最初の回避行動試験において、bwマウスは、隣接する暗い小部屋に移動する時間が有意に長かった。しかし、2回以降の試験では、野生型マウスと同等であった。ストレスに満ちていると推定される新規環境に対する感受性あるいは恐怖を感じる程度が低いと推定された。

(2) bwマウスにおける *Mitf-M* mRNA のスプライシング異常産物の同定:

① L1 エlementの挿入により、*Mitf* 遺伝子転写産物のスプライシング様式が変化し、4種の異常 *Mitf-M* 産物が生成される(図1)。L1 エlementの一部断片(104塩基対)がエクソンとして利用され、その挿入断片(L1)に存

在する翻訳停止コドンによりC末端領域を欠損した Mitf-M(L1)が生成される(図 1a)。すなわち、Mitf(L1)は転写活性化領域とDNA結合領域を欠損する。さらに、エクソン3を欠失した Mitf-M(del3)、エクソン4を欠失した Mitf-M(del4) (図 1c)、その両方を欠失した Mitf-M(del3,4)が生成される(図 1d)。以上より、メラノサイト特異的な Mitf-M の発現低下の一因として、選択的スプライシングの異常であることが明らかになった。

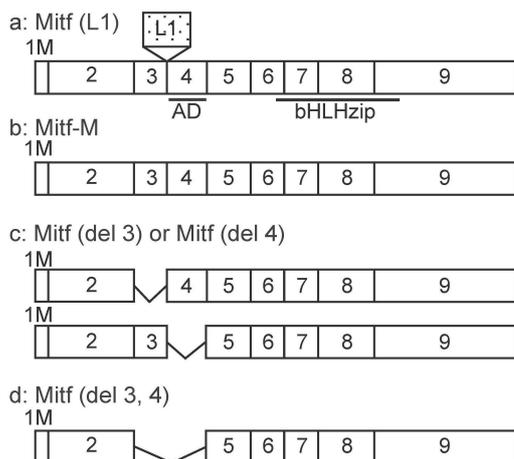


図1 異常 Mitf-M の模式図

AD は転写活性化領域を、bHLHzip は DNA 結合と二量体形成に参与する領域を示す。b は正常の Mitf-M を示す。図は論文①より改変。

② 上記異常 Mitf-M をコードする mRNA 産物は bw マウス脳でも発現されていた。また、野生型マウス脳における解析の結果、Mitf-M mRNA は小脳、大脳で発現されており、特に視床下部で高発現されていたが、延髄では発現が低かった。Mitf-M mRNA が脳の種々領域に発現されている事実は、Mitf-M の未知の機能を示唆している。成果(1)で述べた、恐怖あるいはストレスに対する感受性との関連で興味深い。

③ MITF-M mRNA はヒト脳でも発現されている。よって、ヒトにおいても、MITF-M の未知の機能が示唆される。

(3) 異常スプライシング産物の発現 cDNA の機能をヒト網膜色素上皮細胞株である ARPE-19 細胞における一過性発現系により解析した。すなわち、チロシナーゼ遺伝子プロモーターの制御下にあるレポーターを用いて、上記4種の異常 Mitf-M の転写活性化能、あるいは転写抑制作用を解析した。エクソン4を欠失する Mitf-M は転写活性化を示さなかった。エクソン4が活性化領域をコードしている事実と合致した。さらに、エクソン4を欠失する Mitf-M は正常の Mitf-M の機能を抑制することが示唆された。いわゆるドミナント・ネガティブ効果である。一方、DCT 遺伝

子プロモーターの制御下にあるレポーターを用いた解析でも、同様な結果を得たが、ドミナント・ネガティブ効果は検出できなかった。

以上より、bw マウスの病態として、選択的スプライシングの異常による Mitf-M の量的低下に加え、ドミナント・ネガティブ効果による Mitf-M の機能的低下も伴うことが示唆された。

(4) ヒト網膜色素上皮細胞株 (ARPE-19 と D407) と正常ヒト網膜色素上皮細胞を用いて、発現する MITF アイソフォームを解析した。その結果、ARPE-19 と正常ヒト RPE 細胞は主に MITF-D を発現しているが、D407 細胞は分子量の大きい MITF-A あるいは MITF-H を発現することが示唆された。さらに、ARPE-19 と正常ヒト網膜色素上皮細胞では、β-カテニンの発現量が多く、Wnt シグナル伝達系が優位であることが示唆された。そこで、β-カテニンに対する siRNA を ARPE-19 に導入し、β-カテニンの発現量を減少させたところ、MITF タンパクの発現量が低下することを確認した。以上により、MITF-D の発現には Wnt シグナルが関与することが示唆された。

折しも、平成 25 年 8 月に、加齢黄斑変性症に対し、誘導多能性幹細胞 induced pluripotent stem (iPS) cells を利用した治療が承認された。よって、網膜色素上皮細胞の恒常性維持機構を解明する本研究は、移植後の iPS 細胞の機能維持法の開発にも貢献する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計2件)

① Takeda K, Hozumi H, Nakai K, Yoshizawa M, Satoh H, Yamamoto H, Shibahara S. (2014) Insertion of long interspersed element-1 in the Mitf gene is associated with altered neurobehavior of the black-eyed white Mitf^{mi-bw} mouse. Genes Cells 19, 126-140. 査読有、doi: 10.1111/gtc.12117.

② Nishihara D, Yajima I, Tabata H, Nakai M, Tsukiji N, Katahira T, Takeda K, Shibahara S, Nakamura H, Yamamoto H. (2012) Otx2 is involved in the regional specification of the developing retinal pigment epithelium by preventing the expression of Sox2 and Fgf8, factors that induce neural retina differentiation. PLoS One 7(11):e48879. 査読有、doi: 10.1371/journal.pone.0048879.

[学会発表] (計 4 件)

- ① 武田和久、穂積大貴、仲井邦彦、吉澤美季、山本博章、柴原茂樹、
black-eyed white *Mitf^{mi-bw}* mouse における *Mitf*-M mRNA のスプライシング異常と行動異常、
第 25 回日本色素細胞学会年次学術大会、
2013 年 11 月 16 日-17 日、大阪大学
- ② Kazuhisa Takeda, Hiroki Hozumi, Kunihiro Nakai, Miki Yoshizawa, Hiroshi Satoh, Hiroaki Yamamoto, Shigeki Shibahara,
An insertion of long interspersed element-1 in the *Mitf* gene is associated with altered volitional motor activity of the black-eyed white *Mitf^{mi-bw}* mouse,
第 86 回日本生化学会大会、2013 年 9 月 11 日-13 日、横浜パシフィコ
- ③ 穂積大貴、武田和久、天野恭子、東谷篤志、山本博章、柴原茂樹、
聴覚・色素異常を呈する black-eyed white *Mitf^{mi-bw}* mouse のメラノブラスト分化異常、
第 35 回日本分子生物学会年次学術大会、
2012 年 12 月 11 日-14 日、福岡国際会議場
- ④ Kazuhisa Takeda, Hiroki Hozumi, Yasuko Yoshida-Amano, Atushi Higashitani, Hiroaki Yamamoto, Shigeki Shibahara,
Melanocyte-specific *Mitf*-M is a key regulator for development of melanoblasts: Lessons from the black-eyed white *Mitf^{mi-bw}* mouse,
第 24 回日本色素細胞学会年次学術大会、
2012 年 11 月 24 日-25 日、長浜バイオ大学

[その他]

ホームページ

<http://www.mbap.med.tohoku.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴原 茂樹 (SHIBAHARA, Shigeki)
東北大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：00154253

(2) 研究分担者

武田 和久 (TAKEDA, Kazuhisa)
東北大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30311559

古山 和道 (FURUYAMA, Kazumichi)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：80280874

(3) 連携研究者

吉澤 美季 (YOSHIZAWA, Miki)
東北大学・大学院医学系研究科・技術専門職員
研究者番号：50221669